

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kristýna Jelšíková

VOLTAMETRIE FYTOSTEROLŮ NA BOREM DOPOVANÉ DIA- MANTOVÉ ELEKTRODĚ

Voltammetry of phytosterols on boron-doped diamond
electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 12. července 2018.

Abstrakt:

Obsahem této práce je studium elektrochemické oxidace vybraných fytosterolů (stigmasterol, β -sitosterol a ergosterol) na borem dopované diamantové elektrodě v prostředí kyseliny chloristé a acetonitrilu. Studována byla stabilita voltametrické odezvy fytosterolů v čase. Porovnávány výšky píků pro různě zvolené rychlosti scanu a závislost signálu fytosterolů na obsahu vody v roztoku, dále studováno v prostředí dalších anorganických kyselin (kyselina sírová a trihydrogenfosforečná) a soli (chloristan sodný) v acetonitrilu. Nejvhodnější pro detekci vybraných fytosterolů bylo prostředí kyseliny chloristé, které by bylo možné nahradit i prostředím chloristanu sodného. Naopak naprosto nevhodné se ukázalo prostředí kyseliny trihydrogenfosforečné, kdy signály fytosterolů byly málo odlišitelné od základního elektrolytu.

Klíčová slova

Borem dopovaná diamantová elektroda, dehydratace, fytosterol, oxidace, voltametrie

Abstract:

Electrochemical oxidation of selected phytosterols (stigmasterol, β -sitosterol and ergosterol) was studied on boron-doped diamond electrode in perchloric acid in acetonitrile. The stability of the voltammetric response of phytosterols, dependence of peak heights on scan rate and the dependence of the phytosterol signal on the water content in the measured solution was studied. Voltammetric behaviour was further studied using other inorganic acids (sulfuric acid and trihydrogenphosphoric acid) and salts (sodium perchlorate) as supporting electrolyte. Using perchloric acid or sodium perchlorate were suitable for voltammetric studies. On the contrary, trihydrogenphosphoric acid as supporting electrolyte was quite inappropriate, because the signals of the phytosterols were poorly developed.

Key words:

Boron-doped diamond electrode, dehydration, phytosterol, oxidation, voltammetry

Tento výzkum byl proveden v rámci specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260440).

Tato práce vznikla s podporou Grantové agentury České republiky (projekt 18-01710S) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 1440217).

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce RNDr. Karolině Schwarzové, Ph.D. za její cenné rady při vypracovávání mé bakalářské práce a vstřícný přístup. Dále Mgr. Janu Kloudovi za jeho věcné připomínky a rady v průběhu práce v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla velmi poděkovat mé rodině za psychickou i finanční podporu při studiu.

Obsah

Seznam zkratk	- 8 -
1 Teoretická část	- 9 -
1.1 Cíl práce	- 9 -
1.2 Fytosteroly	- 9 -
1.2.1 Struktura, vlastnosti a výskyt fytosterolů	- 9 -
1.2.2 Studované fytosteroly	- 11 -
1.3 Biosyntéza cholesterolu, ergosterolu a fytosterolů	- 12 -
1.4 Analytické metody stanovení ergosterolu a fytosterolů	- 13 -
1.5 BDD elektroda	- 15 -
1.5.1 Příprava BDD filmových elektrod (BDDFE)	- 15 -
1.5.2 Použití BDD filmových elektrod	- 16 -
2 Experimentální část	- 17 -
2.1 Použité chemikálie	- 17 -
2.2 Aparatura	- 17 -
2.3 Vyhodnocení naměřených výsledků	- 18 -
3 Výsledky a diskuse	- 19 -
3.1 Elektrochemická oxidace stigmasterolu, β -sitosterolu a ergosterolu v prostředí acetonitrilu a anorganických kyselin nebo chloristanu sodného	- 19 -
3.1.1 Stabilita voltametrické odezvy sterolů	- 19 -
3.1.2 Závislost výšky odezvy sterolů na rychlosti skenu	- 23 -
3.1.3 Aktivace BDD elektrody	- 25 -
3.1.4 Vliv obsahu vody na odezvu fytosterolů	- 27 -
3.1.5 Vliv základního elektrolytu	- 28 -
3.2 Koncentrační závislost β -sitosterolu v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé	- 31 -
4 Závěr	- 33 -
5 Seznam použitých zdrojů	- 35 -

Seznam zkratek

BDD	borem dopovaný diamant
c	molární koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
CAS	cykloarterolsynthasa
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E	potenciál [mV]
E_{akt}	aktivační potenciál
I	proud [nA]
I_p	proud píku [nA]
LAS	lanosterolsynthasa
LOD	limit detekce
PAS	fotoakustická spektroskopie
ν	rychlost skenu [$\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$]
$\nu^{1/2}$	druhá odmocnina z rychlosti skenu [$(\text{mV} \cdot \text{s}^{-1})^{-1/2}$]
t	čas [min]

1 Teoretická část

1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo prozkoumání elektrochemického chování vybraných fytosterolů (stigmasterolu, β -sitosterolu) a ergosterolu a následná aplikace na stanovování na BDD elektrodě.

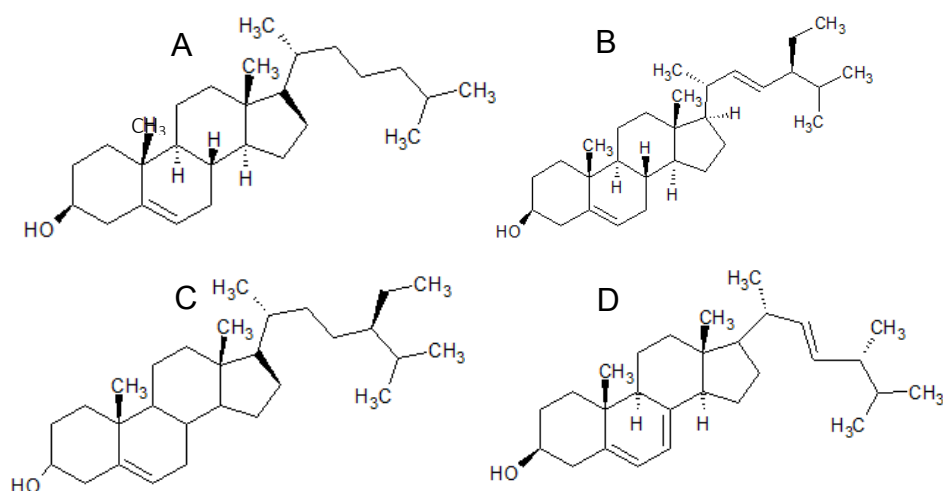
1.2 Fytosteroly

Fytosteroly nebo-li rostlinné steroly jsou lipofilní látky vyskytující se přirozeně v rostlinných buňkách. Doposud bylo identifikováno více než 250 rostlinných sterolů, z nichž mezi nejrozšířenější patří stigmasterol, β -sitosterol a campesterol.

1.2.1 Struktura, vlastnosti a výskyt fytosterolů

Fytosteroly se svou strukturou řadí mezi steroidy. Zpravidla obsahují uhlíkatý řetězec o počtu 27 až 29 uhlíkatých atomů. Základem je cyklopentanoperhydrofenanthren (steran), který má na C₃ navázanu hydroxo- skupinu a na C₅ je mezi uhlíky dvojná vazba. Další derivatizací steranu na C₁₀, C₁₃ a C₁₇ vznikají příslušné steroly (cholesterol, fytosteroly).

Steroly se v rostlinách vyskytují ve směsích. Jejich variabilita spočívá v postranním řetězci a rozložení dvojných vazeb. Zatímco cholesterol má ve svém postranním řetězci na C₂₀ a C₂₅ methylovou skupinu, fytosteroly jsou v dané oblasti více rozmanité. Příkladem může být stigmasterol, který oproti cholesterolu (struktury viz obr. 1.1) na C₂₄ disponuje ethylovou skupinou a na C₂₂ se nachází dvojná vazba. Díky této dvojné vazbě snadněji podléhá oxidačním procesům [1].



Obr. 1.1 Struktura cholesterolu (A), stigmasterolu (B), β -sitosterolu (C) a ergosterolu (D).

Fytosteroly jsou sloučeniny z velké části hydrofobní, ale vždy mají na C3 polární hydroxylovou skupinu, jejímž důsledkem je zvýšení polarity této části molekuly. Jednou z možností jak lze tyto steroly klasifikovat, je na volné fytosteroly a esterifikované steroly. Volné fytosteroly obsahují volnou 3 β -hydroxylovou skupinu a tvoří majoritní část produktů biosyntézy fytosterolů. Dále zmíněné esterifikované steroly vznikají tak, že volná 3 β -hydroxylová skupina volných fytosterolů je esterifikována nenasycenými mastnými kyselinami s dlouhými řetězci např. olejovou a linoleovou. Další skupinou mohou být sterylované glykosidy, které jsou tvořeny navázáním monosacharidů (např. glukosou) opět na 3 β -hydroxylovou skupinu [2].

Rostlinné steroly vyskytující se v potravinách kompetují s cholesterolem o absorpci ve střevech. Fytosteroly tvoří micely a tím snižují vstřebávání cholesterolu.

Fytosteroly tvoří základ buněčných membrán rostlin. Jejich funkce je v rostlinách podobná, jakou zastává cholesterol v živočiších. Zde je cholesterol základní složkou živočišné membrány [3]. V důsledku své struktury se podílejí na fluiditě a permeabilitě buněčné membrány. Steroly se nacházejí v malém množství v membráně endoplazmatického retikula, tonoplastů i mitochondrií. Mohou se nacházet jak v membránách jednotlivých buněk či organel, tak i volně v intracelulární tekutině. V relativně malém množství se dále vyskytují v membráně chloroplastů [4]. Tyto steroly můžeme nalézt v potravinách jako jsou oleje, oříšky nebo například v zelenině [5].

1.2.2 Studované fytosteroly

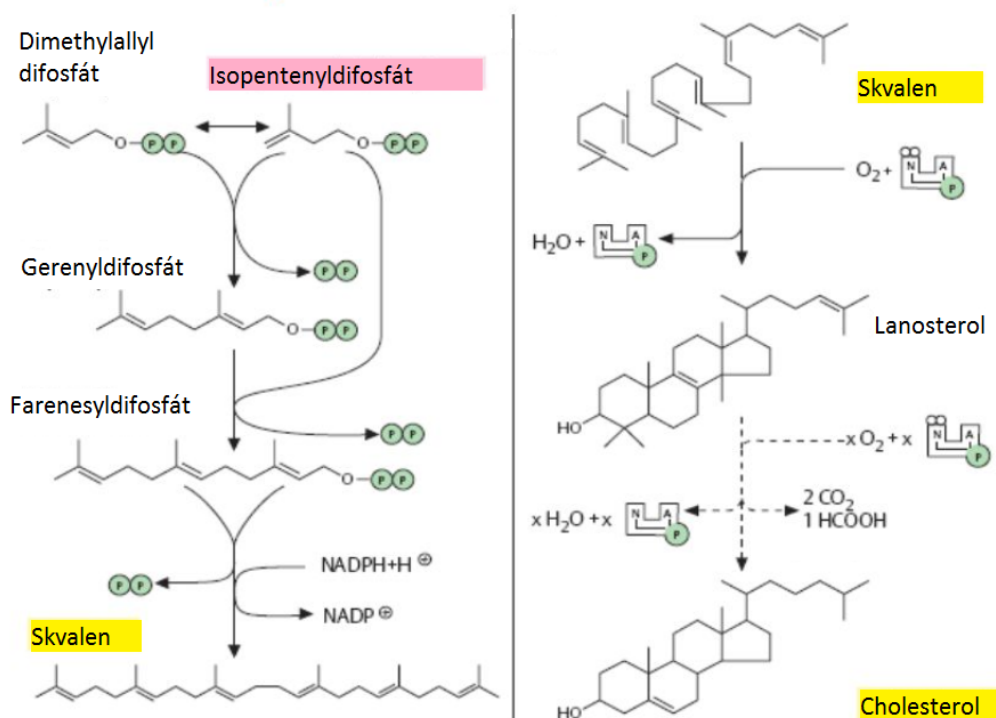
Stigmasterol (3 β -hydroxy-24-ethyl-5,22-cholestadien) je steroidní derivát, který má na C₃ steroidního jádra hydroxylovou skupinu a dvojnou vazbu v pozici C₅, tím se jeho struktura podobá cholesterolu. Odlišení od něj je možné nalézt v pozici C₁₇, kde má stigmasterol jiné uspořádání postranního řetězce (obr. 1.1 B). Stigmasterol v buňce ovlivňuje její proliferaci a diferenciaci. [2] V čistém stavu je to krystalická bílá látka. Jeho molární hmotnost je 412,69 g.mol⁻¹ [6].

β -sitosterol (24-ethylcholest-5-en-3-beta-ol) je také steroidní derivát. Od cholesterolu se odlišuje uspořádáním postranního alkylového řetězce (obr. 1.1 C). V rostlinných buňkách ovlivňuje propustnost jejich membrány. Tento fytosterol je také bílá krystalická látka v čistém stavu o molární hmotnosti 414,72 g.mol⁻¹ [5].

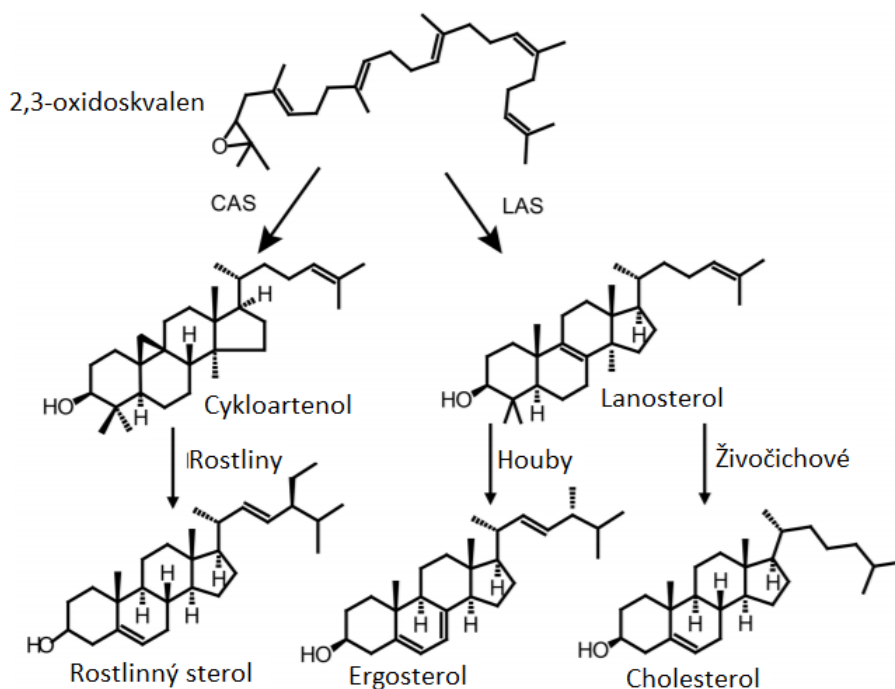
Ergosterol (3 β -hydroxy-5,7,22-ergostatrien) je fytosterol obsažený převážně v houbách. Je provitaminem D₂. Od ostatních zkoumaných sterolů se významně odlišuje přítomností dvou dvojných vazeb na steroidním skeletu; dvojně vazby jsou v konjugaci, umístěné na C₅ a C₇ (obr. 1.2 D), díky nim je tak oproti sterolům s jednou dvojnou vazbou včetně stigmasterolu a β -sitosterolu lépe stanovitelný spektrometrickými metodami. Tento sterol je v čistém stavu bílá krystalická látka o molární hmotnosti 396,66 g.mol⁻¹ [7].

1.3 Biosyntéza cholesterolu, ergosterolu a fytosterolů

Biosyntéza rostlinných sterolů se až do vzniku skvalenu nikterak neliší od biosyntézy cholesterolu (obr. 1.2). Následuje pro každý fytosterol konkrétní dráha.



Obr. 1.2 Schéma biosyntézy cholesterolu. (převzato a upraveno z <https://docplayer.cz/15442969-Struktura-a-funkce-lipidu.html>, viděno 31. 7. 2018).



Obr. 1.3 Schéma biosyntézy fytosterolů, ergosterolu a cholesterolu. (převzato z [8] a upraveno)

V říši živočichů a hub je 2, 3-oxidoskvalen přeměněn na lanosterol díky lanosterolsyntáze (LAS) (obr. 1.3). Lanosterol je univerzální prekurzor pro biosyntézu jak cholesterolu tak ergosterolu. Z lanosterolu je získán cholesterol tepelnou cholesterogenezí [9, 10]. Za jeho přeměnou stojí deset enzymatických kroků. Prekurzorem pro rostlinné steroly je cykloartenol, který vzniká v přítomnosti cykloartenolsyntázy (CAS). LAS gen byl pozorován pouze u velmi mála druhů rostlin. Pro fytosteroly jsou možné dvě syntetické dráhy buď přes cykloartenol nebo lanosterol. V rostlinách probíhá syntéza cholesterolu hypoteticky přes jednoduchou biosyntetickou cestu a přes ty samé enzymy, které produkují fytosteroly [11, 12].

Biosyntéza fytosterolů (v tomto případě stigmasterolu a β -sitosterolu) probíhá z cykloartenolu přes šest prekurzorů (ty mají společné s cestou vzniku campesterolu) – 24-methylenecykloartenol, cykloeukalenol, obtusifoliol, 4 α -methylergostatrienol, 4 α -methylergostadienol a 24-methylenelofenol. Po této sloučenině přeměněna zkoumaných fytosterolů probíhá jinou biosyntetickou dráhou a přes 24-ethylidenolofenol, Δ^7 avenasterol, $\Delta^{5,7}$ avenosterol a isofukosterol. Následně vzniká první ze zkoumaných látek β -sitosterol, ten je zároveň prekurzorem pro vznik stigmasterolu [13].

1.4 Analytické metody stanovení ergosterolu a fytosterolů

Analytickými metodami pro stanovení ergosterolu jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí (HPLC–UV) probíhající na reverzní fázi v prostředí acetonitril/methanol (70:30, v/v) [14] nebo fotoakustická spektroskopie (PAS), která byla použita pro detekci bioaktivních složek v myceliu *Agaricus brasiliensis* [15]. Dále lze použít tenkovrstvou chromatografii (TLC) [16].

Fytosteroly lze stanovit analytickými metodami jako jsou kapilární elektrochromatografie (CEC) [17], plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrickou detekcí (GC–MS) [18] nebo plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (GC–FID). Pro tuto metodu je stanoven limit detekce (LOD) 0,27 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ [19].

Obecně lze říci, že možnosti detekce fytosterolů jsou poměrně omezené, jelikož molekula neobsahuje chromoforní nebo fluoroforní části pro UV nebo fluorescenční detekci; pro plynovou chromatografii je problémem nízká těkavost, tj. nutnost derivatizace těchto molekul. Problematická je i jejich přímá elektrochemická oxidace nebo redukce. V práci [20] bylo k ampérometrické detekci fytosterolů použito bezvodé prostředí chloristanu lithného v acetonitrilu a elektrody ze skelného uhlíku. Limit detekce

byl v rozmezí 0,816 – 3,40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

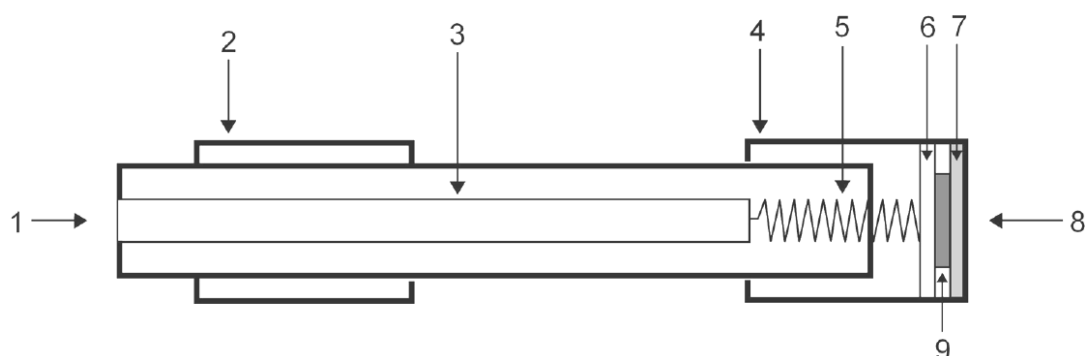
Citlivost jmenovaných analytických metod pro stanovení ergosterolu je v následující tabulce.

Tab 1.1 Analytické metody využívané pro detekci ergosterolu.

Metoda	LOD / $\mu\text{mol.l}^{-1}$
HPLC – UV	0,8818
TLC	0,2521

1.5 BDD elektroda

Borem dopovaný diamant patří v posledních třech desetiletích k využívanému a zkoumanému materiálu především v oboru elektrochemie. Této pozornosti si zasloužil díky svým vlastnostem, jako je nízký zbytkový proud a chemická i mechanická stabilita [21]. Jednou z nejdůležitějších vlastností tohoto materiálu je široké potenciálové okno. Šířka okna je závislá na kvalitě filmu a často dosahuje hodnot kolem 3,5 V. V anodické oblasti končí potenciálové okno v prostředích obsahujících vodu do potenciálu + 2,0 V (kyselá prostředí). Proto jsou BDD elektrody využívány především tam, kde jiným způsobem není možné tohoto vysokého kladného potenciálu dosáhnout [22]. Při stanovení organických látek elektrochemicky na elektrodách často dochází k adsorpci polárních látek na povrch elektrod. Tato adsorpce je často ireverzibilní a tak dochází k pasivaci elektrody. K adsorpci polárních látek jsou často citlivé uhlíkové elektrody jejichž hybridizace je sp^2 . Oproti tomu jsou BDD elektrody na základě své sp^3 hybridizace a terminaci povrchu vodíkem k adsorpci značně rezistentní [23].



Obr 1.5 Schéma BDD elektrody v diskovém uspořádání; 1 kontakt pro připojení k potenciostatu, 2 teflonové tělo elektrody, 3 elektrický kontakt, 4 šroubovací nástavec, 5 pružina, 6 kovová destička z obou stran pokrytá grafitem, 7 těsnění, 8 kontakt s roztokem, 9 BDDFE na keramické podložce (převzato z [21])

1.5.1 Příprava BDD filmových elektrod (BDDFE)

Diamantové filmy neobsahující dopant jsou připravovány za vysokého tlaku a vysoké teploty (metoda high pressure, high temperature – HPHT). Jsou zde napodobeny podmínky, při kterých vzniká přírodní diamant. Za těchto podmínek dochází k přetvoření monokrystalického diamantu na čistý diamant s pravidelným uspořádáním (tetraedrické) [22].

Metoda, která se používá pro přípravu BDD filmů, se nazývá chemická depozice

par (CVD – chemical vapor deposition) a je prováděna za teplot nízkých. Z mnoha technik, kterými je CVD možno provádět, se pro přípravu diamantových filmů využívají dvě: termální iniciace žhaveným vláknem (teplota 2000 – 2900 K) nebo elektromagnetická excitace za použití mikrovlnného ohřevu (3000 MHz – 300 000 MHz) [22].

Chemickou reakcí plynné fáze a následným ukládáním produktů na povrch substrátu (často křemík) vzniká BDD film. Plynná fáze obsahuje vodík a methan, který slouží jako zdroj uhlíku. Jako dopant boru je používán diboran, trimethylboran nebo nitrid boru [22, 23].

1.5.2 Použití BDD filmových elektrod

V elektrochemii se BDD elektrody používají především k oxidaci organických látek v odpadních vodách, kdy je BDD elektroda použita jako anoda při potenciálu vyšším, než je anodický rozklad vody. Při této reakci vznikají na povrchu elektrody vysoce reaktivní hydroxylové radikály, které mohou organické látky oxidovat až na oxid uhličitý. Případně může docházet ke konverzi organických látek na jiné organické sloučeniny, které jsou biologicky odbouratelné. Dále se tyto elektrody používají jako elektrochemické senzory např. ve voltametii nebo ampérometrické detekci v průtokových metodách, jako je např. HPLC, FIA a CE [24-26].

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Studované látky byly stigmasterol, β -sitosterol a ergosterol od firmy Sigma-Aldrich, jejich deklarovaná minimální čistota byla 95 %. Zásobní roztoky stigmasterolu a β -sitosterolu byly připraveny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, roztok ergosterolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Dalšími použité chemikálie byly analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak: acetonitril pro HPLC od Sigma-Aldrich, kyselina chloristá 70% od Lach-Ner (Neratovice, ČR), kyselina trihydrogenfosforečná 85% od výrobce Penta, kyselina sírová 96% od Lach-Ner (Neratovice, ČR), kyselina dusičná 65% od Lach-Ner (Neratovice, ČR), bezvodý chloristan sodný od výrobce Fluka a alumina od Elektrochemických dektorů (Turnov, ČR).

2.2 Aparatura

Pro měření metodami cyklické a diferenční pulsní voltametrie byl použit přístroj Eko-Tribo Polarograf (software Polar-Pro 5.1) od EcoTrend Plus, Praha.

Pracovní bórem dopovaná diamantová elektroda byla průměru 3 mm, $A = 7, 1 \text{ mm}^2$ od Windsor Scientific (Slough, Velká Británie). Elektroda je tvořena BDD diskem umístěným na těle, které je z materiálu PEEK. Samotná elektroda byla před každým měřením leštěna pomocí suspenze aluminy (Elektrochemické detektory, Turnov) a destilované vody po dobu 30 s.

Jako referenční elektroda byla použita elektroda argentochloridová ($3 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$) (Elektrochemické detektory, Turnov). Pomocnou elektrodou byla elektroda platínová (Elektrochemické detektory, Turnov).

2.3 Vyhodnocení naměřených výsledků

K vyhodnocování grafů, dat a výpočtům byly použity programy: Polar-Pro od Eko-Trend Plus, OriginPro 2015 od OriginLab Corporation z USA a kalkulačka Sencor SEC 160.

Pro získání koncentrační závislosti byly pro provedení diferenční pulsní voltametrie použity podmínky: výška pulsu 100 mV, šířka pulsu 10 ms a rychlost skenu 20 mV.s⁻¹. Pro každou koncentraci byl voltamogram změřen třikrát, znázorněné hodnoty jsou průměrem naměřených hodnot.

Pro stanovení limitu detekce byla nejnižší hodnota koncentrace 0,8 μmol.l⁻¹ měřena pětkrát, mezi jednotlivými skeny byla pracovní elektroda leštěna po dobu 30 s.

3 Výsledky a diskuse

V této kapitole jsou shrnuty výsledky studia elektrochemické oxidace stigmasterolu, β -sitosterolu a ergosterolu v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé, která tvořila základní elektrolyt. V tomto prostředí dochází zřejmě nejprve k dehydratační reakci a vzniku elektroaktivních produktů, stejně jako je tomu u primárních žlučových kyselin a cholesterolu [27]. Tyto produkty jsou dále oxidovány na BDD elektrodě. Dále byl studován vliv jiných kyselin (kyseliny sírové a trihydrogenfosforečné) a chloristanu sodného na voltametrickou odezvu látek. Stabilita odezvy sterolů byla studována v závislosti na čase měření po přípravě roztoků, na rychlosti skenu a na obsahu vody v základním elektrolytu.

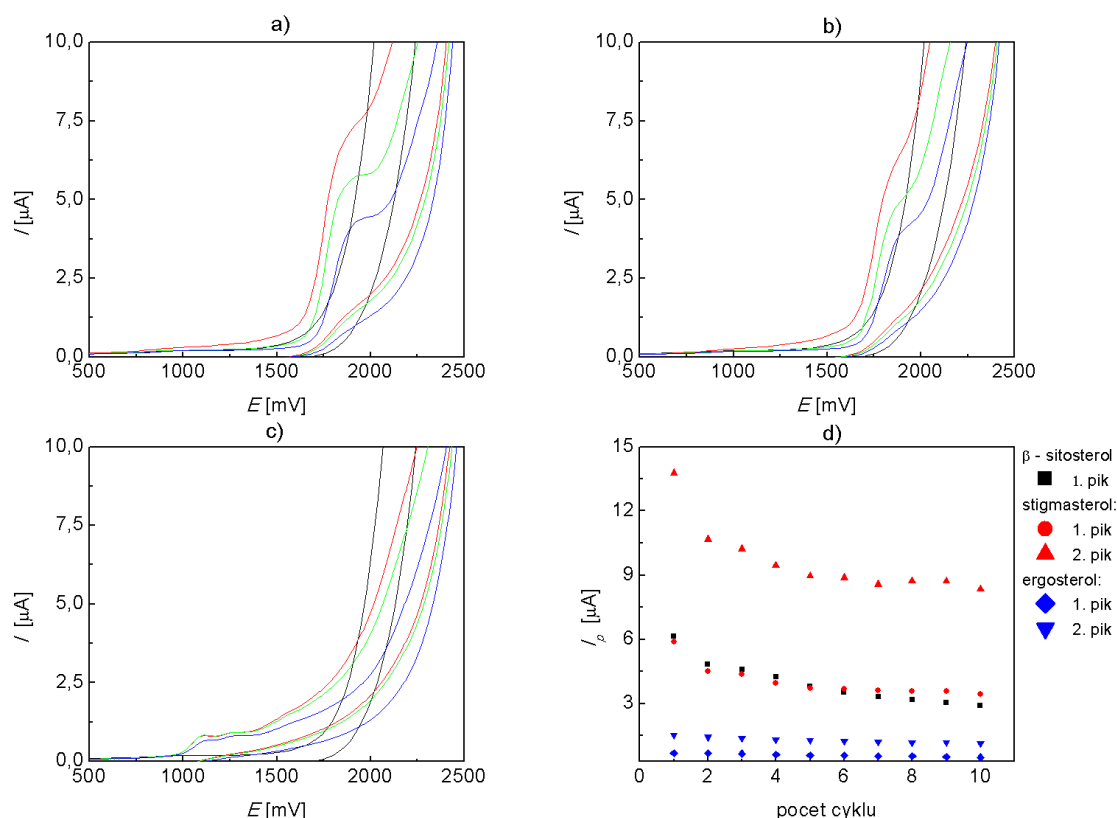
3.1 Elektrochemická oxidace stigmasterolu, β -sitosterolu a ergosterolu v prostředí acetonitrilu a anorganických kyselin nebo chloristanu sodného

Stigmasterol, β -sitosterol a ergosterol byly zpočátku měřeny v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ kyseliny chloristé na základě měření publikovaných Kloudou *et. al* [27], bylo předpokládáno podobné chování jako u cholesterolu na základě jejich podobné struktury. Základní elektrolyt tvořila již zmíněná 0,1 mol.l⁻¹ kyselina chloristá a acetonitril. Obsah vody v daném prostředí byl 0,43 % a je dán přítomností vody v koncentrované kyselině chloristé (w = 0,7).

3.1.1 Stabilita voltametrické odezvy sterolů

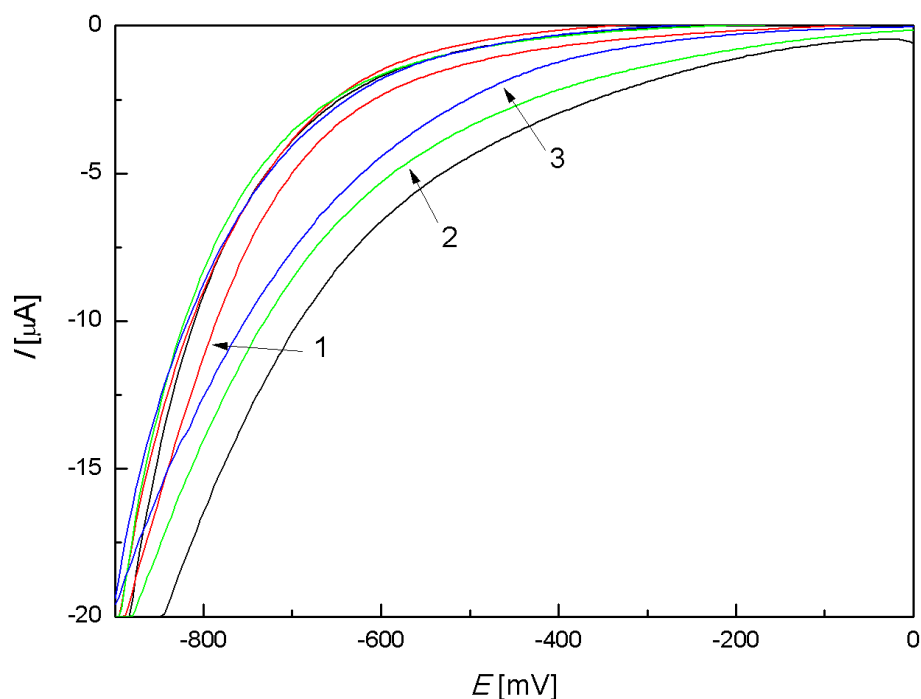
Na obr. 3.1 jsou znázorněny cyklické voltamogramy studovaných sterolů. Oxidace stigmasterolu a β -sitosterolu probíhá při potenciálu cca + 1 850 mV, pro ergosterol, který je strukturně odlišný díky přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb, lze pozorovat dvoustupňovou oxidaci u potenciálu + 1 080 mV a + 1 550 mV.

Z měření deseti následných cyklů (obr. 3.1), které bylo provedeno bez leštění elektrody mezi jednotlivými cykly, je patrné, že dochází k pasivaci elektrody a signály jednotlivých fytosterolů a ergosterolu s přibývajícím počtem cyklů klesají. Proto bylo dále již využíváno jen prvních cyklů, naměřených ihned po vyleštění elektrody. V tomto případě byla odezva (výška jednotlivých signálů sterolů) největší.



Obr. 3.1 Cyklické voltamogramy a) β -sitosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), b) stigmasterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) a c) ergosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,43 %. Rychlost skenu 100 mV.s^{-1} , měřeno v rozsahu 0 až +2 500 mV. Voltamogramy zaznamenány ihned po přípravě smísením roztoku jednotlivých fytosterolů s roztokem HClO_4 . Vybrány tři skeny z deseti následných bez leštění mezi jednotlivými cykly, 1. cyklus – červená barva, 2. cyklus – zelená barva a 10. cyklus – modrá barva. Základní elektrolyt je znázorněn černou barvou. d) Závislost poklesu proudu píků při konstantním potenciálu β -sitosterolu (+ 1 810 mV), stigmasterolu (+ 1 806 mV a + 2 120 mV) a ergosterolu (+ 1 120 mV a + 1 605 mV) na počtu cyklů.

Pozorování bylo prováděno pouze v oblasti kladných potenciálů od 0 mV do + 2 500 mV. V oblasti záporných potenciálů (0 mV až -900 mV) k žádným redukčním nedocházelo, jak vyplývá z obrázku 3.2, nebyly pozorovány ani katodické píky v oblasti kladných potenciálů. Fytosteroly a jejich dehydratační produkty nejsou tudíž za daných podmínek redukovatelné.



Obr. 3.2 Cyklické voltamogramy (1) β -sitosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), (2) stigmasterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) a (3) ergosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,43 %. Rychlost skenu 100 mV.s^{-1} , měřeno v rozsahu 0 až -900 mV . Voltamogramy zaznamenaný ihned po přípravě smísením roztoku jednotlivých fytosterolů s roztokem HClO_4 .

Dále byla studována stálost voltametrické odezvy studovaných sterolů od přípravy roztoků smísením zásobního roztoku sterolu v acetonitrilu s roztokem kyseliny chloristé vzhledem k předpokladu, že v tomto prostředí dochází k dehydrataci sterolů a vzniku elektroaktivních produktů. Např. pro primární žlučové kyseliny bylo potřeba za pokojové teploty 120 min k ustálení voltametričského signálu [27]. Zaznamenané voltamogramy jsou na obrázku 3.3 a), b) a c). Obrázek d) znázorňuje vývoj elektrochemického signálu v závislosti na čase.

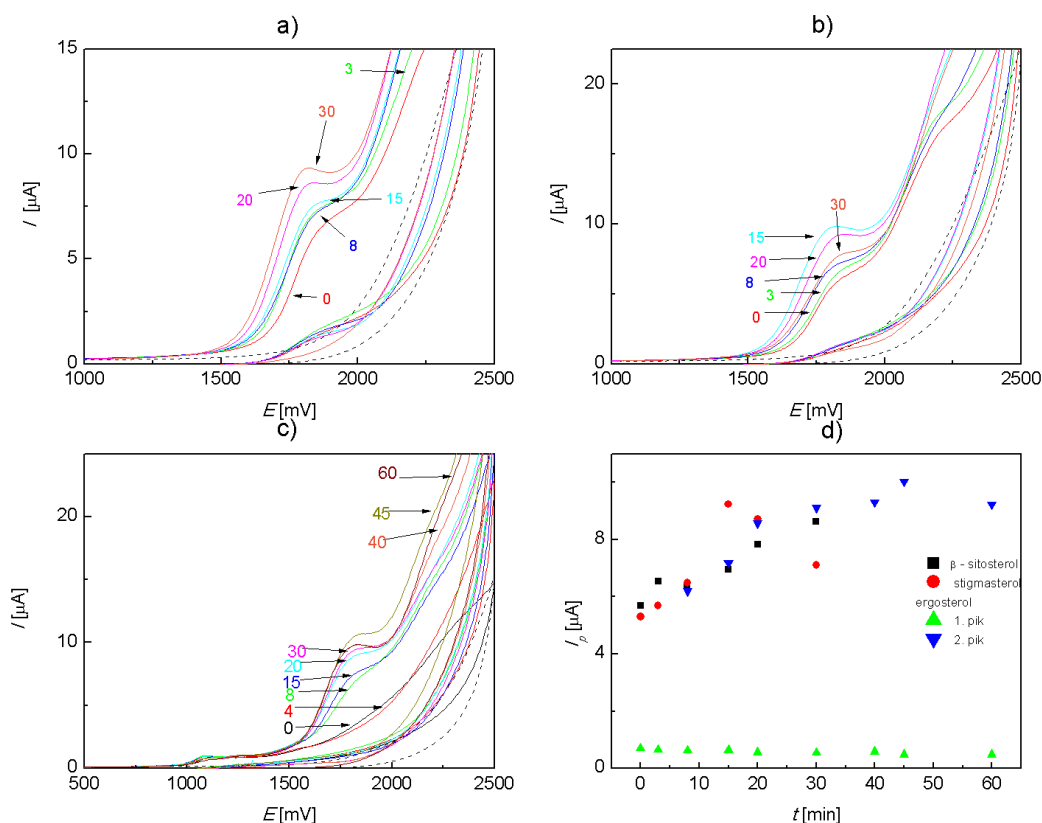
Z obrázku 3.3 a) + b) vyplývá, že pík β -sitosterolu a stigmasterolu je dobře pozorovatelný hned po přípravě měřeného roztoku a následujícím dalším vývojem. Měření bylo prováděno ihned po přípravě (0 min), po dalším vyleštění elektrody (3 min) a dále po 8 min, 15 min, 20 min a 30 min.

Z obrázku 3.3 a) vyplývá, že výška píku β -sitosterolu při potenciálu $+1\,859 \text{ mV}$

pozvolna narůstá a je nejvyšší po 30 minutách. Pro další měření je však postačující velikost odezvy, kterou sterol poskytuje ihned po přípravě. I tato odezva je dostatečně rozlišitelná od cyklického voltamogramu základního elektrolytu.

Dále z obrázku. 3.3 b) je možné pozorovat, že velikost odezvy stigmasterolu, kdy daný pík můžeme pozorovat při potenciálu +1 825 mV, je nejvyšší na rozdíl od β -sitosterolu již 15 minut po přípravě roztoku. Pro další měření bylo využíváno opět jen cyklických voltamogramů získaných ihned po přípravě. I v tomto případě byla výška píku od základního elektrolytu dobře rozeznatelná.

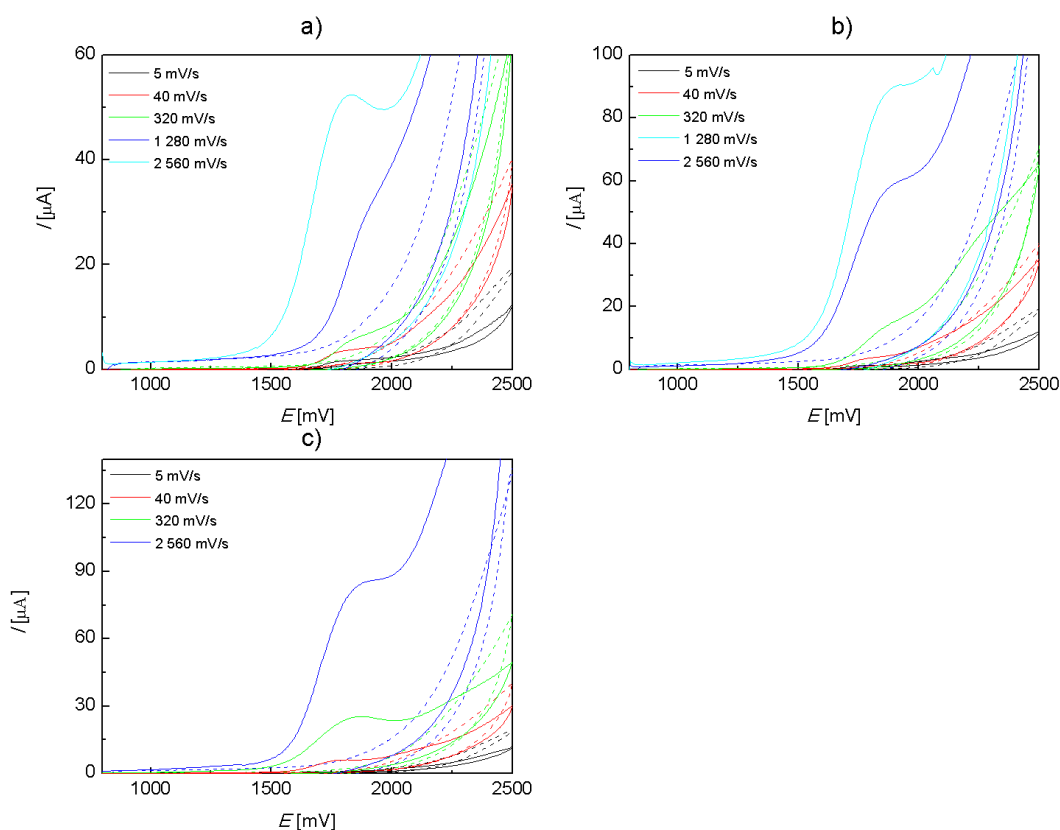
Z obrázku. 3.3 c) byly v případě ergosterolu pozorovány dvě odezvy. První pík při potenciálu +1 113 mV a druhý při potenciálu +1 815 mV. Zatímco první signál je zaznamatelný ihned po přípravě, druhý signál byl nejvyšší až po 45 minutách od přípravy měřeného roztoku. Rozdílná velikost signálu po různých časových intervalech je zřejmě dána probíhajícími dehydratačními reakcemi, kdy jednotlivé signály mohou odpovídat dějům probíhajícím na jiných částech molekuly ergosterolu, nebo se jedná o děje následné. Měření bylo prováděno ihned po přípravě (0 min), po dalším vyleštění elektrody (3 min) a dále po 8 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min, 45 min a 60 min. Stejně jako u předešlých fytosterolů byl ergosterol dále měřen ihned po přípravě. I jeho signál byl pro daná měření postačující.



Obr. 3.3 Cyklické voltamogramy a) β -sitosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), b) stigmasterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) a c) ergosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,43 %. Rychlost skenu 100 mV.s^{-1} , měřeno v rozsahu 0 až +2 500 mV. Voltamogramy zaznamenány ihned po přípravě smísením roztoku jednotlivých fytosterolů s roztokem HClO_4 (0 min.) a následně měřeny po 4, 8, 15, 20 a 30 min., ergosterol měřen dále po 40, 45 a 60 min. Základní elektrolyt je znázorněn černou přerušovanou křivkou. d) Závislost vývoje proudu píků při konstantním potenciálu β - sitosterolu (+ 1 859 mV), stigmasterolu (+ 1 825 mV) a ergosterolu (+ 1 113 a + 1 815 mV).

3.1.2 Závislost výšky odezvy sterolů na rychlosti skenu

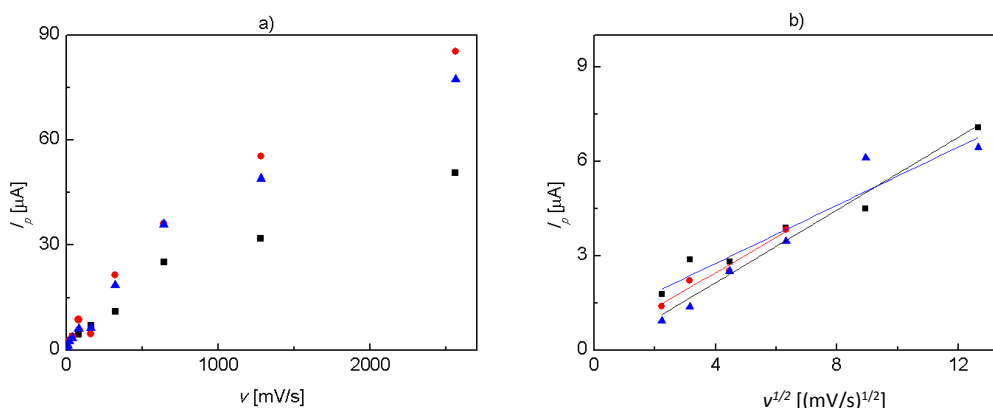
Na obrázku 3.4 je znázorněno měření velikosti signálu fytosterolu v závislosti na zvyšování rychlosti skenu. Pracovní elektroda byla před každým měřením vyleštěna, aby bylo zabráněno ovlivnění výsledků pasivací samotné elektrody. Vrcholy maxim pro jednotlivé fytosteroly jsou obtížně vyhodnotitelné. Pro β -sitosterol a ergosterol bylo pozorováno, že s rostoucí rychlostí se odezva daného fytosterolu zvyšuje. U stigmasterolu je možné vidět, že odezva pro $2\,560 \text{ mV.s}^{-1}$ je nižší než pro $1\,280 \text{ mV.s}^{-1}$.



Obr. 3.4 Cyklické voltamogramy a) β -sitosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), b) stigmasterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) a c) ergosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,43 %. Rychlost skenu znázorněna pro 5 mV.s^{-1} , 40 mV.s^{-1} , 320 mV.s^{-1} a 2560 mV.s^{-1} , měřeno v rozsahu 0 až +2 500 mV. Voltamogramy zaznamenány ihned po přípravě smísením roztoku jednotlivých fytosterolů s roztokem HClO_4 . Základní elektrolyty pro dané rychlosti znázorněny přerušovanou čarou stejné barvy.

Z obrázku 3.5 je možné vidět, že závislost výšky píku na rychlosti skenu není lineární v celém měřeném rozsahu rychlostí $5 - 2560 \text{ mV.s}^{-1}$. Odečet proudu je komplikován určením proudového maxima látek vzhledem k poloze signálu blízko úniku základního elektrolytu. Linearita byla určena pro závislost signálu na druhé odmocnině rychlosti pouze pro nižší rychlosti a to do 160 mV.s^{-1} pro β -sitosterol a ergosterol, pro stigmasterol do 40 mV.s^{-1} . Parametry lineární závislosti pro tento rozsah rychlostí se pro vybrané fytosteroly nachází v tabulce 3.1.

Sterol	Rovnice přímky	R ²
β-sitosterol	$I_p (\mu\text{A}) = 463v^{1/2} (\text{mV.s}^{-1})^{1/2} + 0,900$	0,9591
stigmasterol	$I_p (\mu\text{A}) = 563v^{1/2} (\text{mV.s}^{-1})^{1/2} + 0,203$	0,9656
ergosterol	$I_p (\mu\text{A}) = 578v^{1/2} (\text{mV.s}^{-1})^{1/2} - 0,172$	0,9335



Obr. 3.5 Závislost výšky píku cyklického voltamogramu (■) β-sitosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), (●) stigmasterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) a (▲) ergosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody $0,43 \%$ na a) rychlosti skenu, b) druhé odmocnině rychlosti skenu. Rychlost skenu $5 - 2560 \text{ mV.s}^{-1}$, měřeno v rozsahu $0 \text{ až } +2\,500 \text{ mV}$. Voltamogramy zaznamenány ihned po přípravě smísením roztoků jednotlivých fytosterolů s roztokem HClO_4 .

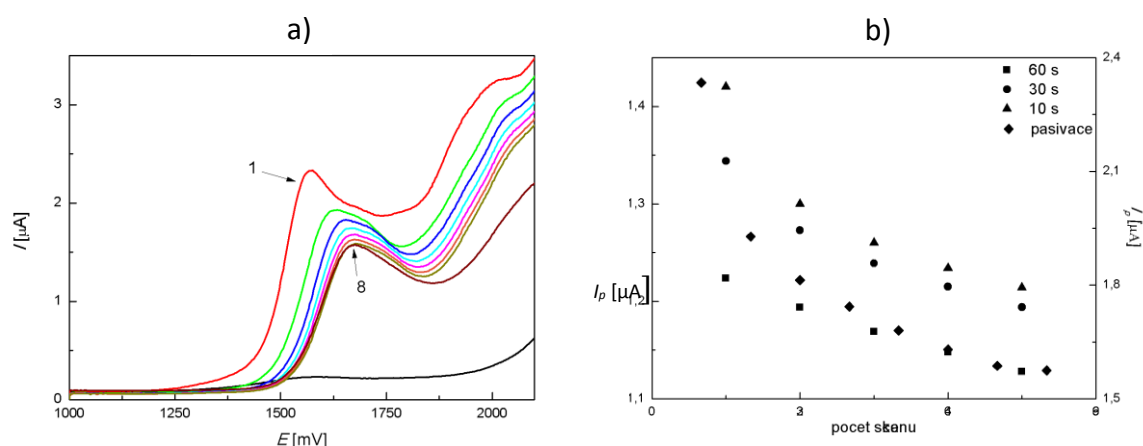
3.1.3 Aktivace BDD elektrody

Dalším krokem bylo studium možností aktivace BDD elektrody, jelikož při opakovaném měření dochází k její pasivaci, jak je zřejmé např. z cyklických voltamogramů na obr. 3.1 a obr. 3.6, kde jsou zaznamenány voltamogramy pro β-sitosterol měřené bez leštění elektrody mezi jednotlivými skeny. Při osmi následných skenech došlo ke snížení odezvy β-sitosterolu o $32,5 \%$, jelikož dochází k pasivaci adsorpcí produktů oxidace na povrch elektrody. Opakovatelnou odezvu lze získat vyleštěním elektrody, kdy pro koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ je relativní směrodatná odchylka (RSD) $7,63 \%$. Tento přístup je však nevhodný vzhledem k nutnosti vyndat elektrodu z měřeného roztoku.

Proto byla testována anodická aktivace in-situ vložení aktivčního potenciálu $+2\,800 \text{ mV}$ a to na 10 s , 30 s a 60 s . Při tomto potenciálu dochází k tvorbě hydroxylových radikálů rozkladem vody a zpravidla k destrukci organického filmu pasivujícího

elektrodu a je tedy běžným způsobem aktivace BDD elektrod [21].

Odezva β -sitosterolu se však i s vkládaným aktivačním potenciálem snižovala. Proto byla elektroda před každým dalším měřením vždy vyleštěna. Anodického aktivačního potenciálu by možná bylo možné využít při dalším prováděném měření s vyšším obsahem vody v roztoku a vyzjištění postačující doby, na kterou by byl potenciál vkládán. Možnou roli může hrát i velikost vkládaného potenciálu, který musí být kladnější než potenciál anodického rozkladu vody.



Obr. 3.6 a) Diferenční pulsní voltamogramy β -sitosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,43 %. Rychlost skenu 20 mV.s^{-1} , měřeno v rozsahu +900 mV až +2 200 mV. Zaznamenán voltamogram ihned po přípravě smísením roztoku a následných 7 voltamogramů bez leštění elektrody mezi jednotlivými scany. b) Pokles proudu píku při anodické aktivaci vložení počátečního aktivačního potenciálu $E_{akt} = +2800 \text{ mV}$ před zaznamenáním diferenčního pulzního voltamogramu β -sitosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,43 %. Rychlost skenu 20 mV.s^{-1} , měřeno v rozsahu +900 až +2 200 mV. E_{akt} vkládán na 60 s, 30 s a 10 s. Porovnání s poklesem I_p z obr. a) (označeno pasivace).

3.1.4 Vliv obsahu vody na odezvu fytosterolů

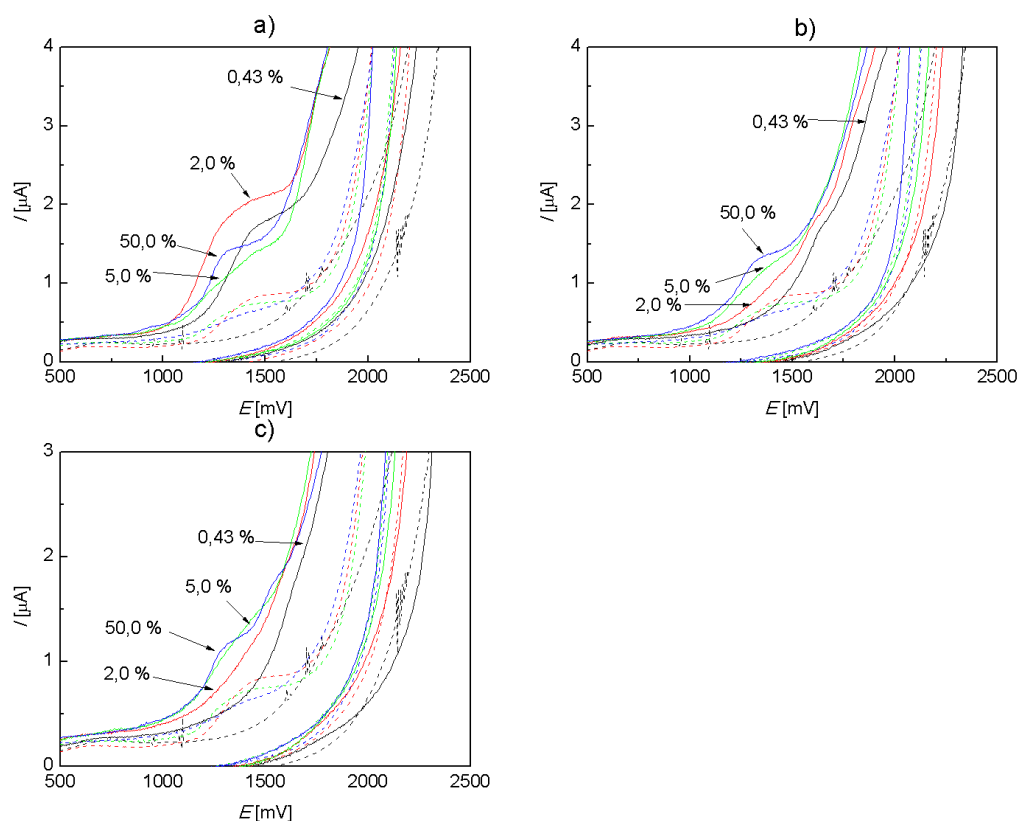
Vzhledem k principu studované elektroanalytické metody, který je založen na prvotní dehydratační reakci sterolů, lze předpokládat, že množství vody v měřeném roztoku bude výrazně ovlivňovat odezvu studovaných sterolů. Proto byly měřeny cyklické voltamogramy sterolů pro koncentrace 0,43 % – 50,0 % v acetonitrilu.

Z obrázku 3.7 a) je patrné, že odezva β -sitosterolu se pro jednotlivé obsahy vody liší. Nejvyšší je signál při obsahu vody pro 2,0 %. Pokud je však brán rozdíl oproti základnímu elektrolytu, tak největší rozdíl naměřených proudů je v prostředí, které obsahuje minimální množství vody 0,43 %.

Dále z obrázku 3.7 b) vyplývá, že signál pro stigmasterol je nejvyšší při obsahu vody 50,0 %. Pokud opět bude brán v úvahu rozdíl proti základnímu elektrolytu, jako vhodné prostředí pro stanovení stigmasterolu je minimální možné množství vody 0,43 %. Z obrázku je též možné pozorovat, že poloha píku se mění s množstvím vody, kterou roztok obsahuje.

Na obrázku 3.7 c) je možné vidět, že odezva ergosterolu je nejvyšší při obsahu vody pro 5,0 %. Při obsahu vody 50,0 % v měřeném roztoku se kromě prvních dvou píků pozorovaných u ergosterolu objeví i pík třetí. Jeho vytvoření může být způsobeno další reakcí tohoto sterolu s kyselinou chloristou a obsaženou vodou.

Vzhledem k jisté proměnlivosti výsledků mezi jednotlivými steroly bude vliv vody na odezvu sterolů studován podrobněji v další fázi práce. Bude nutné opět zohlednit časový faktor a teplotu, při které dehydratace probíhá.



Obr. 3.7 Cyklické voltamogramy a) β -sitosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), b) stigmasterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) a c) ergosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,43 %; 2,0 %; 5,0 % a 50,0 %. Rychlost skenu 100 mV.s^{-1} , měřeno v rozsahu 0 až +2 500 mV. Voltamogramy zaznamenaný ihned po přípravě směsí roztoku jednotlivých fytosterolů s roztokem HClO_4 . Základní elektrolyty pro příslušné obsahy vody zaznamenaný přerušovanou čarou.

3.1.5 Vliv základního elektrolytu

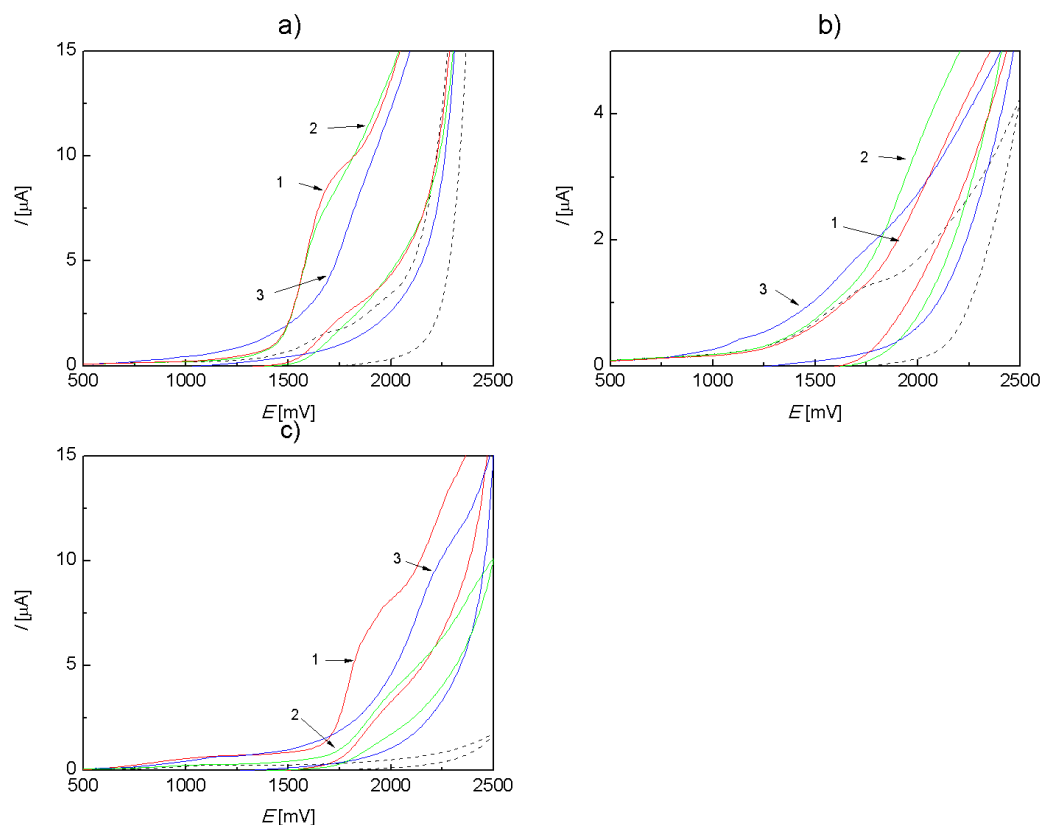
Základní elektrolyt, tj. použitá kyselina, je zároveň dehydratačním činidlem, proto byla dále testována možnost využití dalších kyselin.

Na obrázku 3.8 je znázorněna závislost odezvy fytosterolů a ergosterolu na použitém dehydratačním činidle. Z obrázku 3.8 a) vyplývá, že v prostředí kyseliny sírové, kdy celkový obsah vody činí 0,041 % jsou dobře rozeznatelné píky β -sitosterolu a stigmasterolu, naopak u ergosterolu je dobře rozlišitelný jen pík první, který je viditelný při potenciálu +1 113 mV. Od základního elektrolytu jsou všechny steroly odlišitelné dobře. Jako potenciálně vhodné se toto prostředí jeví pro β -sitosterol a stigmasterol. U ergosterolu je v tomto prostředí špatně odlišitelná druhá odezva, která je viditelná

v prostředí s kyselinou chloristou. Příčinou ovšem může být opět doba potřebná k vývoji tohoto signálu, jelikož znázorněné voltamogramy byly měřeny hned po přípravě roztoku.

Prostředí kyseliny trihydrogenfosforečné (celkový obsah vody je 0,174 %), je pro detekci vybraných sterolů v porovnání s ostatními nevhodné, jak je patrné z obrázku 3.8 b). Jednotlivé odezvy jsou špatně rozlišitelné od základního elektrolytu a nemají vyvinutá proudová maxima. V tomto prostředí vykazuje nejlepší odezvu ergosterol, u kterého jsou patrné obě odezvy oproti základnímu elektrolytu.

Bylo studováno i prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu (obr. 3.8 c)), kdy odezvy β -sitosterolu a stigmasterolu jsou oproti základnímu elektrolytu velmi dobře viditelné a rozlišitelné. V tomto prostředí se potenciály oxidace nacházejí pro stigmasterol v + 1 900 mV a pro β -sitosterol v + 1 810 mV. Oproti prostředí kyseliny chloristé nedošlo k výraznému posunu signálu u těchto dvou sterolů. Pouze u ergosterolu jsou málo rozlišitelné oba píky, pro stanovení tohoto sterolu je toto prostředí nevhodné. Pro β -sitosterol a stigmasterol je možné uvažovat měření místo v kyselině chloristé v sodné soli této kyseliny, kdy je zřejmě oxidován přímo daný sterol. Obdobné podmínky byly použity pro oxidaci fytosterolu v práci [20], kdy jako základní elektrolyt byl použit chloristan lithný. Nicméně je třeba si uvědomit, že toto prostředí neobsahuje vodu a její přítomnost v roztoku bude významně zužovat potenciálové okno.



Obr. 3.8 Cyklické voltamogramy (1) β -sitosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), (2) stigmasterolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) a (3) ergosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) v 0,1 mol.l⁻¹ a) H_2SO_4 v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,041 %, b) H_3PO_4 v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,174 % a c) NaClO_4 v prostředí acetonitrilu bez přídavku vody. Rychlost skenu 100 mV.s⁻¹, měřeno v rozsahu 0 až +2 500 mV. Voltamogramy zaznamenaný ihned po přípravě smísením roztoků. Základní elektrolyt zaznamenaný přerušovanou čarou.

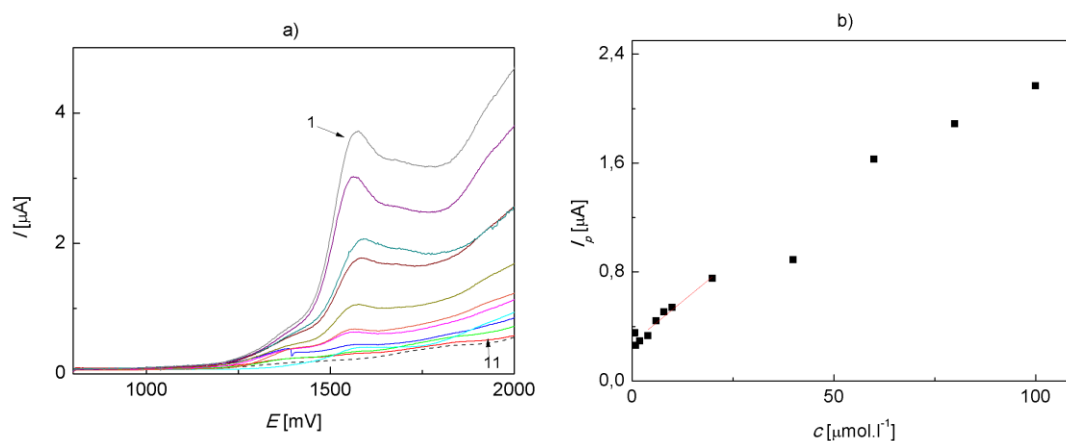
3.2 Koncentrační závislost β -sitosterolu v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé

Koncentrační závislost byla změřena metodou diferenční pulsní voltametrie pro β -sitosterol v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Z obrázku 3.9 můžeme pozorovat závislost výšky signálu na koncentraci analytu v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ roztoku kyseliny chloristé v acetonitrilu s obsahem vody $0,43 \%$. Nejvyšší odezvu je možné vidět při nejvyšší koncentraci β -sitosterolu, tj. $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Naopak nejnižší pík při koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Signál diferenčního pulsního voltamogramu tedy klesá s klesající koncentrací β -sitosterolu obsaženého v roztoku.

Před měřením každého roztoku byla elektroda vyleštěna suspenzí aluminy a destilované vody, čímž bylo předejito její pasivaci. Koncentrační závislost je zobrazena na obrázku 3.9 b) a parametry této závislosti v tabulce 3.2.

Tab. 3.2 Parametry koncentrační závislosti β -sitosterolu v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu za minimálního možného obsahu vody $0,43 \%$.

rovnice kalibrační přímky	$I_p [\mu\text{A}] = +0,0244c[\mu\text{mol.l}^{-1}] + 0,280$
R^2	0,9580
LOD / $\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,627
koncentrační rozsah / $\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,8 – 20



Obr. 3.9 a) Diferenční pulsní voltamogramy β -sitosterolu (v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ (1) až $1 \cdot 10^{-6}$ (11) mol.l $^{-1}$ v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,43 %. Jednotlivé koncentrace β -sitosterolu v obr. b) – koncentrační závislost. Rychlost skenu 20 mV.s^{-1} , měřeno v rozsahu +900 mV až +2 200 mV.

4 Závěr

Cílem této práce bylo zkoumání elektrochemické oxidace dvou vybraných fytosterolů (β -sitosterolu a stigmasterolu) a ergosterolu v prostředí umožňujícím jejich dehydrataci. Z provedených měření, byly získány informace o vhodných podmínkách pro voltametrická měření těchto sterolů.

Všechny studované steroly poskytují voltametrický signál v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu ihned po přípravě jejich roztoku a to v oblasti potenciálů od + 1 000 mV do + 1 850 mV. Poměrně pomalá změna výšky této odezvy umožňuje její využití pro další charakterizaci chování sterolů na BDD elektrodě.

Bylo zjištěno, že odezva β -sitosterolu v prostředí kyseliny chloristé a acetonitrilu mírně narůstá do 30 min. od přípravy roztoku a pro stigmasterol do 15 min. Pro ergosterol bylo zjištěno, že první pík se objevuje a je nejlépe viditelný při měření ihned po přípravě roztoku smísením ergosterolu s kyselinou chloristou s acetonitrilem. Naopak druhý pík se v závislosti na čase zvyšuje a je nejlépe viditelný až po 45 minutách. Studované elektrochemické děje jsou v rozsahu nižších rychlostí skenu do 160 mV.s^{-1} řízeny difúzí.

Jelikož dochází k pasivaci elektrodového povrchu, musel být tento aktivován leštěním mezi jednotlivými skeny. Anodická aktivace *in-situ* v měřeném roztoku se ukázala jako nedostatečná.

Voltametrická odezva stigmasterolu i β -sitosterolu je viditelná i v prostředí kyseliny sírové, ta se však ukázala naprosto nevhodná pro ergosterol. V přítomnosti kyseliny fosforečné nejsou voltametrické odezvy fytosterolů dobře vyvinuty. V bezvodém prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu poskytuje dobře vyvinuté signály stigmasterol a β -sitosterol.

Při studování vlivu vody na oxidaci se jako nejvhodnější ukázalo prostředí obsahující 0,43 % vody. Odezvy fytosterolů od základního elektrolytu byly s tímto obsahem vody nejlépe viditelné. Toto prostředí bylo použito pro proměření koncentrační závislosti β -sitosterolu. Závislost je lineární v rozsahu $0,8 - 20 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ a nejnižší měřitelná koncentrace je $0,627 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Další měření bude zaměřeno na optimalizaci voltametrické metody pro stanovení všech sterolů s ohledem na časovou stálost signálu a obsah vody v roztoku. Pozornost bude věnována možnosti elektrochemické detekce v průtokových metodách, např.

HPLC, kdy obsah vody v systému bude ovlivňovat jak detekci, tak separaci studovaných fytosterolů. Jiným směrem dalšího vývoje je studium mechanismu a identifikace produktů jak dehydratačních, tak elektrochemických reakcí.

5 Seznam použitých zdrojů

- [1] Y.G. Lin, D. Knol, M. Menendez-Carreno, R. Baris, H.G. Janssen, E.A. Trautwein, Oxidation of sitosterol and campesterol in foods upon cooking with liquid margarines without and with added plant sterol esters, *Food Chemistry*, 241 (2018) 387-396.
- [2] S. Amar, W. Ecke, H.C. Becker, C. Mollers, QTL for phytosterol and sinapate ester content in *Brassica napus* L. collocate with the two erucic acid genes, *Theoretical and Applied Genetics*, 116 (2008) 1051-1061.
- [3] M.D. Bin Sintang, S. Danthine, A. Brown, D. Van de Walle, A.R. Patel, I. Tavernier, T. Rimaux, K. Dewettinck, Phytosterols-induced viscoelasticity of oleogels prepared by using monoglycerides, *Food Research International*, 100 (2017) 832-840.
- [4] A. Rocco, S. Fanali, Analysis of phytosterols in extra-virgin olive oil by nano-liquid chromatography, *Journal of chromatography. A*, 1216 (2009) 7173-7178.
- [5] L.H. Ellegard, S.W. Andersson, A.L. Normen, H.A. Andersson, Dietary plant sterols and cholesterol metabolism, *Nutrition Reviews*, 65 (2007) 39-45.
- [6] K. Matsuoka, E. Kajimoto, M. Horiuchi, C. Honda, K. Endo, Competitive solubilization of cholesterol and six species of sterol/stanol in bile salt micelles, *Chemistry and Physics of Lipids*, 163 (2010) 397-402.
- [7] S.K. Duffy, J.V. O'Doherty, G. Rajauria, L.C. Clarke, A. Hayes, K.G. Dowling, M.N. O'Grady, J.P. Kerry, J. Jakobsen, K.D. Cashman, A.K. Kelly, Vitamin D-biofortified beef: A comparison of cholecalciferol with synthetic versus UVB-mushroom- derived ergosterol as feed source, *Food Chemistry*, 256 (2018) 18-24.
- [8] R.B. Japelt, J. Jakobsen, Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis, *Frontiers in Plant Science*, 4 (2013).
- [9] S.E. Milner, N.P. Brunton, P.W. Jones, N.M. O'Brien, S.G. Collins, A.R. Maguire, Bioactivities of Glycoalkaloids and Their Aglycones from *Solanum* Species, *J. Agric. Food Chem.*, 59 (2011) 3454-3484.
- [10] L. Dinan, Phytoecdysteroids: biological aspects, *Phytochemistry*, 57 (2001) 325-339.
- [11] W.D. Nes, Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols, *Chemical Reviews*, 111 (2011) 6423-6451.
- [12] K. Bloch, THE BIOLOGICAL SYNTHESIS OF CHOLESTEROL, *Vitamins and Hormones-Advances in Research and Applications*, 15 (1957) 119-150.
- [13] P.D. Sonawane, J. Pollier, S. Panda, J. Szymanski, H. Massalha, M. Yona, T. Unger, S. Malitsky, P. Arendt, L. Pauwels, E. Almekias-Siegl, I. Rogachev, S. Meir, P.D. Cardenas, A. Masri, M. Petrikov, H. Schaller, A.A. Schaffer, A. Kamble, A.P. Giri, A. Goossens, A. Aharoni, Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism, *Nature Plants*, 3 (2017).
- [14] J.C.M. Barreira, M. Oliveira, I. Ferreira, Development of a Novel Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms, *Food Anal. Meth.*, 7 (2014) 217-223.
- [15] F.M. de Oliveira, J.B. Mokochinski, Y.R. Torres, H.S. Dalla Santa, P.P. Gonzalez-Borrero, Photoacoustic spectroscopy applied to the direct detection of bioactive compounds in *Agaricus brasiliensis* mycelium, *J. Biol. Phys.*, 44 (2018) 93-100.
- [16] T. Kosuri, S. Nayak, M.Z. Gul, K. Rupula, S.R. Beedu, TLC-Digital Image-Based Fluorometric Analysis of Ergosterol and Chitin Content in Food Grains Artificially Infested with *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*, *Food Anal. Meth.*, 11 (2018) 1267-1280.
- [17] S.L. Abidi, Capillary electrochromatography of sterols and related sterol esters derived from vegetable oils, *J. Chromatogr. A*, 1059 (2004) 199-208.

-
- [18] B.C. Xu, L.X. Zhang, F. Ma, W. Zhang, X.P. Wang, Q. Zhang, D.L. Luo, H.Y. Ma, P.W. Li, Determination of free steroidal compounds in vegetable oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, *Food Chemistry*, 245 (2018) 415-425.
- [19] W.H. Liu, B. Ding, X.M. Ruan, H.T. Xu, J. Yang, S.M. Liu, Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas chromatography-flame ionization detection, *J. Chromatogr. A*, 1163 (2007) 304-311.
- [20] N. Ito, H. Hakamata, F. Kusu, Simultaneous determination of beta-sitosterol, campesterol, stigmasterol, and brassicasterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Methods*, 2 (2010) 174-179.
- [21] B.J. Musilová Jana, Pecková Karolina, POUŽITÍ DIAMANTOVÝCH FILMOVÝCH ELEKTROD DOPOVANÝCH BOREM PRO STANOVENÍ ORGANICKÝCH LÁTEK, *Chemické Listy*, 109 (2009) 469-478.
- [22] M.P. Schwander, K., A review of diamond synthesis by CVD processes, *Diam. Relat. Mat.*, 20 (2011) 1287-1301.
- [23] A. Kraft, Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2 (2007) 355-385.
- [24] S.F. Marco Antonio Quiroz Alfaro, Carlos Alberto Martínez-Huitle, Yunny Meas Vong, Boron Doped Diamond Electrode for the Wastewater Treatment, *Braz. Chem.Soc.*, 17 (2006) 227-236.
- [25] M. Panizza, G. Cerisola, Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants, *Chem Rev*, 109 (2009) 6541-6569.
- [26] P. Canizares, J. Lobato, R. Paz, M.A. Rodrigo, C. Saez, Electrochemical oxidation of phenolic wastes with boron-doped diamond anodes, *Water research*, 39 (2005) 2687-2703.
- [27] J. Klouda, J. Barek, P. Kocovsky, T. Herl, F.M. Matysik, K. Nesmerak, K. Schwarzova-Peckova, Bile acids: Electrochemical oxidation on bare electrodes after acid-induced dehydration, *Electrochem. Commun.*, 86 (2018) 99-103.